

桑白皮가 대식세포의 NO, TNF- α 및 IL-1 α 생산에 미치는 영향

安在圭* · 安德均* · 趙在天**

ABSTRACT

The Effects of Cortex Mori on NO, TNF- α and IL-1 α production by macrophage

Ahn, Jae-Kyu* · Ahn, Duk-kyun* · Cho, Jae-Chon**

*Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine Kyung Hee University Seoul Korea

**Korea Food & Drug Administration

Cortex Mori (*Morus alba* L.), the root bark of mulberry tree has been used as an autiphlogistic, diuretic and expectorant in herbal medicine. Recently, a few papers reported that phenolic extract of Cortex Mori had the hypotensive, hypoglycemic, antiviral and anticancer effects, and hot water extract of Cortex Mori(CM) had inhibitory effect on the degranulation and histamine release from activated mast cells. These previous studies suggest a possibility that CM has an antidotal activity against inflammation which was mediated mainly by macrophage-secreting inflammatory factors.

This study was performed to evaluate the influences of CM on carrageenan-induced edema *in vivo* and release of inflammatory mediators such as NO, TNF and IL-1 by macrophages stimulated with LPS or IFN- γ *in vitro*.

* 경희대학교 한의과대학 본초학교실

** 식품의약품 안전청

Subcutaneous injections of carrageenan into the mouse paw rapidly induced local edema by increasing vascular permeability, but single intraperitoneal injection of CM extract at 30 minutes before carrageenan suppressed the development of edema. NO- and TNF production from macrophage stimulated by LPS or INF- γ were significantly suppressed, especially TNF secretion by up to 3-4 folds. LPS stimulated IL-1 production was also inhibited, but not significantly. Cell viability assay verified that the inhibition was not due to general cell toxicity.

These results suggest that reduction of NO, TNF and IL-1 production may be one of the means by which CM prevent inflammation associated diseases.

I. 서론

桑白皮는 뽕나무과에 속하는 落葉喬木인 뽕나무 *Morus alba* L. 및 同屬近緣植物의 뿌리껍질을 건조한 것으로 겨울에 뿌리껍질을 채취하여 코르크층을 제거한 다음 햇볕에 말린 것이다.¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾¹⁰⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾

桑白皮는 《神農本草經·中品》에 桑根白皮라는 이름으로 “味甘寒主傷中五勞六極羸瘦崩中脈絕補虛益氣”⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ 라고 처음 수록된 이래로 桑根皮, 桑皮, 白桑皮라는 이름¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾ 으로 사용되어 왔으며, 현대의 中藥學¹⁷⁾ 과 本草學⁴⁾ 에서는 그 性味, 歸經, 效能主治에 대하여 “桑白皮의 甘寒한 性味는 下降하는 성질이 있고, 주로 肺經에 들어가 肺熱을 내려주므로 喘息咳嗽을 가라앉히는 장점이 있다.” 또한 “利水消腫의 효능이 있고, 아울러 肺氣를 肅降시켜 水道를 通調시키니 水腫實證으로 小便不利, 面目浮腫, 혹은 水飲停肺로 脹滿喘急한 증상을 치료한다.”고 기술하고 있다. 그리고, “성질이 寒하여 下降시키는 작용이 있으므로 喘息咳嗽가 肺寒에 속하는 자는 사용을 꺼린다”고 하였다.

최근에 桑白皮의 성분연구로 여러종의 성분들이 분리되었는데, flavone류 성분인 morusin, mulberrin, mulberrochromene, cyclomulberrin,

cyclomulberrochromene, mulberrofuran A, kuwanon A, kuwanon B, kuwanon D (I)kuwanon E (II)kuwanon F (III)kuwanon H, sanggenon A (I)sanggenon B (II) 및 moracenin A, moracenin B, moracenin C, moracenin D 등이 확인되었고, 또한 betulinic acid, α -amyrin, β -amyrin, undecaprenol, dodecaprenol, 有機酸, 탄닌 등도 분리되었다.¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾

현대약리실험으로 여러 연구자들에 의하여 다음과 같은 연구결과를 발표하였는데, 즉 집토끼에게 2g/kg의 桑白皮煎劑를 灌胃하거나 흰쥐에게 桑白皮추출물 300~500mg/kg을 복강주사하였을 때 모두 利尿作用이 있어서 尿量 및 나트륨, 칼륨이온과 염화물의 배출량을 고르게 증가시켰다고 발표하였다. 또한 에테르, 물 혹은 메탄올 추출물 1g/kg을 토끼에게 피하주사하여 혈압이 하강되었으며, 작용도 비교적 지속적이었고, 이러한 혈압하강은 kuwanon G, kuwanon H, moracenin A, moracenin B, moracenin D와 관련된다고 증명하였다. 그리고, 桑白皮추출물은 離體개구리의 심장에 억제작용이 있었으며, 개구리의 下肢血管에 대해서 수축작용이 있고, 離體토끼의 耳血管에 대해서는 확장작용이 있었다고 발표하였다. 이외에도 부탄올추출물을 개에게 정맥주사하였을 때 胃腸管活動을 현저히 증

가시켰으며, 물추출물은 이런 작용이 없었다. 또한, 抗菌작용에 대해서는 體外實驗으로 100%煎劑는 황색포도상구균, 이질균 및 진균에 대해 억제작용이 있었으며, 결핵균에 대해서는 효과가 없었다고 발표하였고, 鎮靜작용, 安靜작용, 抗驚厥작용, 鎮痛작용, 降溫작용, 血糖降下작용도 발표되었다.¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾ 기타 抗바이러스작용²⁴⁾ 抗癌작용²⁵⁾ 및 抗아라키돈산 대사작용²⁶⁾ 등을 증명하였으며, 최근에는 桑白皮의 수용성 추출액은 compound 48/80, triton X-100, spermine 등의 비만세포 활성화 인자들에 의한 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 억제시키는 항알레르기성 작용이 있다고 보고²⁷⁾²⁸⁾ 되었다.

한편, 대식세포(macrophage)는 자연면역(natural immunity)에서 중요한 역할을 할 뿐 아니라 특이 획득면역(specific acquired immunity)에 관여함으로써 다양한 숙주방어(host defense)와 유지(maintenance)에 관여한다.²⁹⁾³⁰⁾ 또한, 염증반응시에는 reactive oxygen species (ROS)와 reactive nitrogen species (RNS) 등 cytotoxin과 IL-1, TNF- α 및 IL-6 등 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체를 방어하는 중요한 역할을 하기도 하나²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾ 이로 인하여 동시에 정상 조직의 DNA 등 생체내의 여러물질에 손상을 초래하기도 하며,³¹⁾³²⁾³³⁾ 암의 전이를 촉진시키기도 하는 등³⁴⁾ 양면성을 가지는 세포이다.

한편, 桑白皮의 페놀추출액은 抗아라키돈산 대사작용을 갖는 것으로 보고⁹⁾ 되어 있고 아라키돈산과 prostaglandin E(PGE) 대사에는 대식세포에서 생산되는 IL-1과 TNF- α 가 중요한 역할을 한다는 보고³⁵⁾³⁶⁾가 있으며 대식세포로부터 생산되는 RNS의 한 종류인 nitric oxide (NO)가 cyclooxygenase coenzyme을 활성화시킨다는 보고³⁷⁾가 있다. 또한 앞에서 언급한 바와같이 桑白皮의 수용성추출물이 자극물질에 의하여 활성화 되었을 때 여러가지 염증성 물질을 방출시키는 비만세포의 탈과립을 억제시킨다는 보고²⁷⁾²⁸⁾³⁸⁾와 대식세포 세포질막(plasma mem-

brane)에도 비만세포와 유사하게 α_2 - 및 β_2 -adrenergic receptor가 존재한다는 보고³⁹⁾ 등으로 미루어 보아 桑白皮의 수용성 추출물이 염증에 관계된 대식세포의 기능에도 여러가지 변화를 유발시킬 수 있음을 추측케한다.

이에 본 연구에서는 桑白皮의 항염증작용의 기전중 일부를 알아보기 위하여 염증과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 대식세포 유래 싸이토카인의 일종인 TNF- α 및 IL-1과 RNS의 일종인 NO의 생성에 미치는 桑白皮의 수용성 추출물의 영향을 알아보고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 식품의약품안전본부 실험동물자원실에서 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 12시간 조명주기의 조건하에서 사육된 6~8주령의 C57BL/6 mouse를 암수 구별없이 사용하였으며, 물과 사료는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였고 가급적 stress를 받지 않도록 하였다.

2. 시료(수용성 桑白皮 용액)

일정량의 桑白皮를 2,000ml의 증류수에 넣어 2시간 동안 중탕하여 얻은 桑白皮용액을 여과시킨 후 회전진공농축기를 사용하여 증류수를 완전히 제거하였다. 무게를 측정하고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCOBRL)에 일정한 농도 (200mg/ml)로 녹여 냉장(4°C) 보관중이던 2주 이내의 신선한 桑白皮 용액을 실험 목적에 따라 다양한 농도로 희석하여 사용하였다.

3. Carrageenan 유도 종창반응

수용성 桑白皮추출물의 염증에 대한 영향을 평가하기 위하여 carrageenan lambda를 이용한 foot edema test 방법⁴⁰⁾을 수정 보완하여 실시하였다. 즉, carrageenan lamda(Sigma, St Louis, MO)를 생리식염수로 1% 용액으로 만든 다음 40 μ l를 마우스의 후지족척에 피하주사하여 국소염증반응을 유도하였다. 이때 桑白皮의 투여는 carrageenan주사 30분전에 1mg/mouse 또는 2mg/mouse를 마우스의 복강내로 주사하여 실시하였다. 그 후 염증반응의 평가는 carrageenan을 주사하고 3시간후에 족척 종창정도로 측정 하였다.

4. 복강대식세포의 분리

Mouse의 복강내에 thioglycollate broth(29.8g/l, Difco) 1.5ml을 주사한 후 4~5일째에 HBSS를 복강내로 주입하여 복강 삼출세포를 채취하였다. 이를 HBSS로 3회 원심(500g, 5min) 세척하고 5% Fetal Bovine Serum(FBS, Sigma)이 첨가된 Minimum Essential Medium(MEM, GIBCOBRL)으로 세포수가 1×10^6 cells/ml이 되도록 재부유시킨 후 실험목적에 따라 96-well 또는 24-well flat bottomed plate (CORNING)의 각 well에 일정량씩 가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 2~3시간 정치 시켰다. 이때 plate에 부착되지 않은 세포는 FBS-free MEM으로 가볍게 3회 세척하여 제거하였다.

5. NO 생산능 측정

1) 생산

96-well plate의 각 well에 1×10^6 cells/ml의 복강 삼출세포를 100 μ l씩 분주하고 부착된 대식세포 단일층에 5% FBS 함유 MEM 으로 희석한 桑白皮용액만을 가한 군(I군) 및 I군에 LPS(2 μ g/ml) 또는 IFN- γ (25IU/ml)을 가한 군(II군)으로 나누어 실시하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C, 5%

CO₂ 하에서 20시간 배양하였으며, 이후 plate를 원심한 다음 배양액을 취하였다.

2) 측정

배양액내의 NO함량 측정은 nitrite를 NO생산의 지표로 이용한 Griess반응⁴¹⁾을 이용하여 실시하였다. 간기하면, 96-well plate의 각 well에 배양종료 즉시 취한 배양액을 50 μ l씩 넣고, 30% acetic acid에 용해한 1% sulfanilamide와 60% acetic acid에 용해한 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride의 동량 혼합액(V/V, 1:1, Griess reagent) 100 μ l 씩을 가하여 잘 흔들어 준 다음 5~10분 반응시켜 발색정도를 ELISA reader(Molecular Devices, Emax)를 사용하여 540nm에서 측정하였다. 한편, 배양액내의 NO 정량은 매 실험마다 배양액에 Griess reagent를 가하여 얻은 흡광도를 농도별 NaNO₂(0, 25, 50, 75 및 100 μ M, Sigma)와 Griess reagent를 반응시켜 얻은 흡광도에 대비시켜 산출하였다.

6. Tumor Necrosis Factor(TNF)

생산능 측정

1) 생산

24-well culture plate의 각 well에 1×10^6 cells/ml의 복강 삼출세포를 1ml씩 분주하고 2~3시간 정치시킨 후, 부착된 대식세포 단일층에 5% FBS 함유 MEM으로 희석된 여러농도의 桑白皮 용액만을 첨가한 군(I군)과 동배지에 여러농도의 桑白皮 용액과 lipopolysaccharide(LPS, Sigma) 또는 interferon- γ (IFN- γ , Sigma)를 각각 2 μ g/ml 또는 25IU/ml이 되도록 첨가한 군(II군)으로 나누어 실시하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 20시간 배양하였으며, 이후 plate를 원심하여 배양액을 얻고 멸균된 보존병(glass vial)에 넣어 냉동(-20 $^{\circ}$ C) 보관하였다.

2) 측정

배양액내의 TNF 활성 측정은 Kratz 등의 방법⁴²⁾에 따라 actinomycin D 존재하에서 L929 fibroblast를 용해시키는 능력으로 측정하였다. 간략히 기술하면, antibiotics-free MEM에 계대 배양 중이던 L929 fibroblast (5×10^5 cells/ml)를 96-well plate에 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C , 5% CO_2 하에서 6시간 배양한 후, 현미경으로 부착여부 및 증식정도를 확인하고 배양상층액을 조심스럽게 제거하였다. 여기에 상기의 대식세포 배양액 $50 \mu\text{l}$ 와 actinomycin D ($1 \mu\text{g/ml}$, GIBCO-BRL) $100 \mu\text{l}$ 씩을 각 well에 가하여 37°C , 5% CO_2 하에서 20시간 배양하였다.

이후 여기에 5mg/ml 의 3-[4, 5-dimethylthiazole-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)를 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 가하여 37°C incubator에서 4시간 방치하여 formazan crystal의 형성을 유도하였다. 이어 plate를 원심한 후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 $100 \mu\text{l}$ 씩 가하여 formazan crystal을 완전히 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 570nm 에서 흡광도를 측정하였다.

7. IL - 1 생산능 측정

1) 생산

24-well culture plate의 각 well에 1×10^6 cells/ml의 복강 삼출세포를 1ml 씩 분주하고 2-3시간 정치시킨 후, 부착된 대식세포 단일층에 5% FBS 함유 MEM으로 희석된 여러농도의 槲白皮용액을 첨가한 군(I군)과 동배지에 여러농도의 槲白皮용액과 $20 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 대식세포 단일층에 첨가한 군(II군)으로 나누어 실시하였다. 이를 37°C , 5% CO_2 하에서 20시간 배양하였으며, 이후 plate를 원심하여 배양액을 얻고 멸균된 보존병(glass vial)에 넣어 냉동

(-20°C) 보관하였다.

2) 측정

배양액내의 IL-1 활성 측정은 Sodhi 등⁴³⁾ 및 Yeh 등⁴⁴⁾의 방법을 보완, 수정한 mouse 흉선세포 증식능 검사를 이용하여 측정하였다. 간기하면, 6주령의 C57BL/6 mouse의 흉선을 적출한 다음, RPMI-1640 배지 [100IU/ml penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, $50 \mu\text{M}$ 2-Mercaptoethanol (2-ME)]에서 세절한 다음 2분동안 정치시켜 세포괴를 가라앉히고 세포부유액을 취하였다. 이를 3회 원심세척한 후 5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에 1×10^7 cells/ml로 조정하고, 상기한 I군과 II군 배양액중의 IL-1 활성을 측정하기 위해서 이 흉선세포 부유액에 亞適농도(suboptimal dose)인 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 concanavalin-A (Con-A, Sigma)를 첨가하였다. 이 흉선세포 부유액을 96-well plate의 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 여기에 상기한 I군과 II군 각각의 배양액을 $50 \mu\text{l}$ 씩 가하였다. 이후 37°C , 5% CO_2 하에서 72시간 배양하고 배양 흉선세포의 증식능 평가는 TNF 측정시 사용한 MTT법을 이용하였다.

III. 결 과

1. 수용성 상백피추출물이 carrageenan 유도-종창반응에 미치는 영향

mouse의 족척피하에 1% carrageenan lambda를 주사하고 3시간 후, foot edema test로 槲白皮가 종창반응에 미치는 영향을 평가하였던 바, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 대조군의 종창도에 비하여 carrageenan 주사 30분전에 1mg/mouse 또는 2mg/mouse 의 槲白皮를 투여한 군에서는 각각 29.1 및 25.7%가 억제되었다.

2. 수용성 상백피추출물이 대식세포의 nitric oxide(NO) 생산에 미치는 효과

다양한 농도의 桑白皮가 mouse 복강 대식세포의 생존율에 미치는 영향(Fig. 2)을 먼저 파악한 후 대조군과 비슷한 생존율을 보인 桑白皮의 용량 범위(0.0 ~ 1.0mg/ml)를 대상으로 복강 대식세포를 LPS(2 μ g/ml) 또는 IFN- γ (25IU/ml)로 자극하여 배양한 후 배양 상청액내의 nitric oxide의 농도를 Griess 방법으로 측정하였던 바 그 결과는 각각 Fig.3 및 Fig.4와 같다. 즉, NO의 생성은 桑白皮를 첨가 배양할 경우, LPS로 자극할 시에는 CM의 농도에 비례하여 점점 감소하는 경향을 보였으나 IFN- γ 로 자극할 시에는 0.25 ~ 1.0mg/ml 처리군에서는 농도에 비례하여 점점 감소하였으나 0.13mg/ml 이하의 처리군에서는 대조군에 비하여 약간 증가하는 경향을 보였다.

한편, 桑白皮가 비자극 복강 대식세포의 NO 생산에 미치는 영향을 관찰한 결과(Fig. 5)는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않아 桑白皮는 자발적으로 대식세포로부터 NO 생산을 유도하거나 억제시키지 못하는 것으로 나타났다.

3. 수용성 상백피추출물이 대식세포의 TNF 생산에 미치는 효과

Mouse 복강 대식세포를 여러농도의 桑白皮(0.0~1.0mg/ml) 존재 하에서 LPS(2 μ g/ml) 또는 IFN- γ (25IU/ml)로 자극하여 배양한 후, 대식세포로부터 배양 상청액내로 생산유리된 TNF의 농도를 L929 fibroblast의 증식반응을 이용하여 측정된 결과는 각각 Fig. 6 및 Fig. 7과 같다. 즉, 桑白皮를 첨가 배양한 경우 배양 상청액내의 TNF의 농도는 LPS(2 μ g/ml) 또는 IFN- γ (25IU/ml)로 자극한 경우 공히 桑白皮의 농도에 비례하여 현저히 감소 하였다.

한편, 桑白皮가 비자극 대식세포의 TNF생산

에 미치는 영향을 관찰한 결과 (Fig. 8)는 대조군과 별차이를 보이지 않아 桑白皮는 자발적으로 대식세포로부터 TNF 생산을 유도하거나 억제시키지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 실험에 사용된 CM의 농도 범위(0.0~1.0mg/ml)에 따른 L929 fibroblast의 생존율 변화는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 9).

4. 수용성 상백피추출물이 대식세포의 IL-1 생산에 미치는 효과

Mouse 복강 대식세포를 여러 농도의 桑白皮(0.0~1.0mg/ml) 존재 하에서 LPS(20 μ g/ml)로 자극하여 배양한 후, 대식세포로부터 배양 상청액내로 생산 유리된 IL-1의 농도를 Con-A와의 comitogenesis를 이용한 mouse 흉선세포의 증식 정도로써 측정된 결과는 Fig.10 과 같다.

즉, 대식세포의 IL-1생산은 桑白皮의 농도에 비례하여 점점 감소하는 경향을 보였다. 한편, 桑白皮의 비자극 대식세포의 IL-1생산에 미치는 영향을 관찰한 결과 (Fig. 11)는 桑白皮가 대식세포로부터의 NO생산 및 TNF 생산에 미치는 효과와 유사한 결과를 보였다.

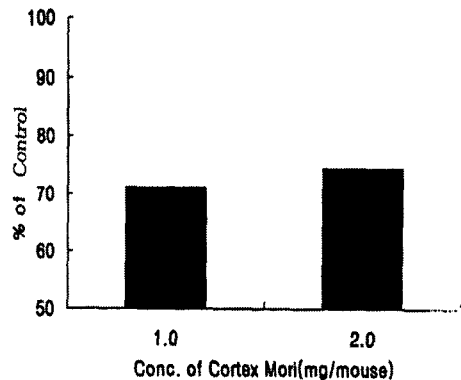


Fig 1. Effect of Cortex Mori(CM) on the carrageenan lambda-induced edema.

Carrageenan lambda(1%, 40 μ l) was injected into subplanter surface of mice. CM was i.p injected at 30min before carrageenan injection. Paw volume was measured at 3 hours after carrageenan injection and mean value of each group(n=5) was normalized as % of control.

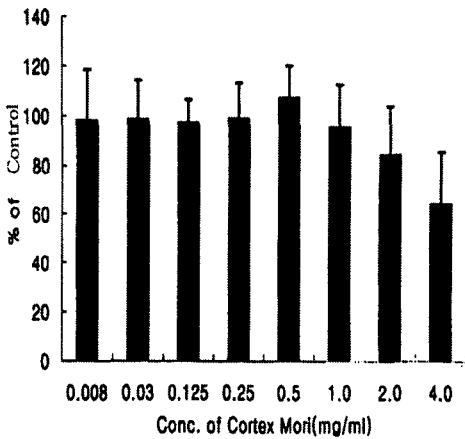


Fig 2. Effect of Cortex Mori(CM) on the viability of peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the presense of CM which was diluted to the indicated concentrations in culture medium. After 20 hours, viability was determined by tetrazoloum salt assay. Values were expressed as the means \pm S.D.

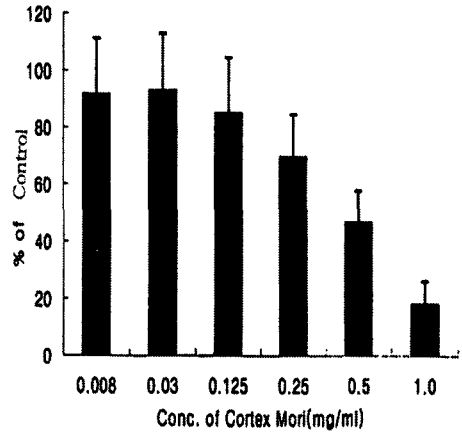


Fig 3. Effect of Cortex Mori(CM) on NO production from LPS-stimulated peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the indicated concentrations of CM and LPS(2μ g/ml). After 20 hours, nitrite accumulation in the supernatant fluids was determined by Griess reaction. Values were expressed as the means \pm S.D.

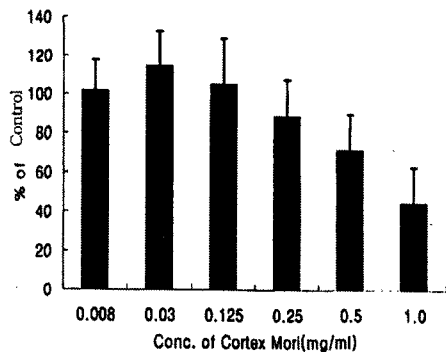


Fig 4. Effect of Cortex Mori(CM) on NO production from INF- γ -activated peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the indicated concentrations of CM and IFN- γ (25IU/ml). After 20 hours, nitrite accumulation in the supernatant fluids was determined by Griess reaction. Values were expressed as the means \pm S.D.

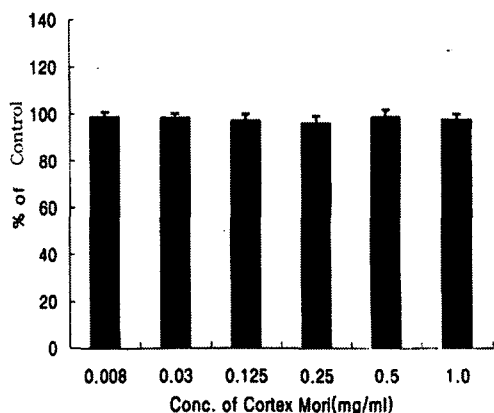


Fig 5. Effect of Cortex Mori(CM) on NO production from resting peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the indicated concentrations of CM. After 20 hours, nitrite accumulation in the supernatant fluids was determined by Griess reaction. Values were expressed as the means \pm S.D.

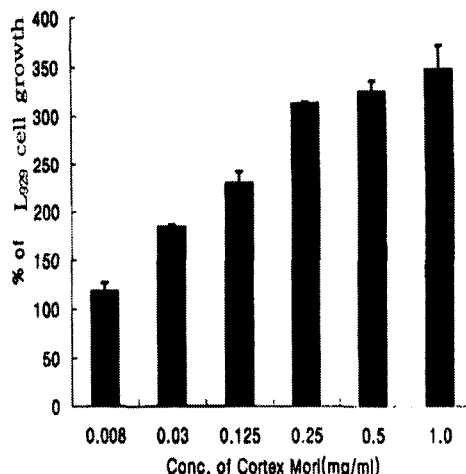


Fig 6. Inhibitory effect of Cortex Mori(CM) on TNF production from LPS-stimulated peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the presense of the indicated concentrations of CM and LPS($2 \mu\text{g/ml}$). After 20 hours, TNF activity in the culture supernatant was measured by proliferation assay using actinomycin-D treated L929 fibroblasts as target cells. Values were expressed as the means \pm S.D.

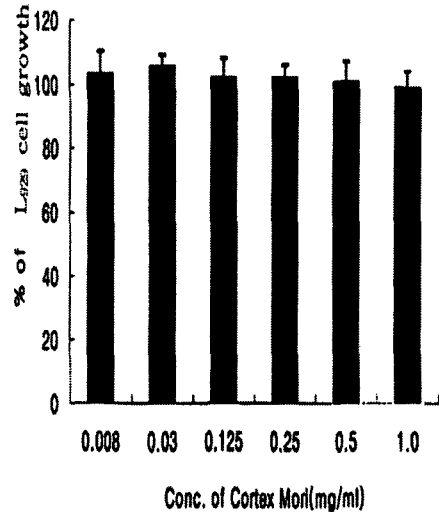
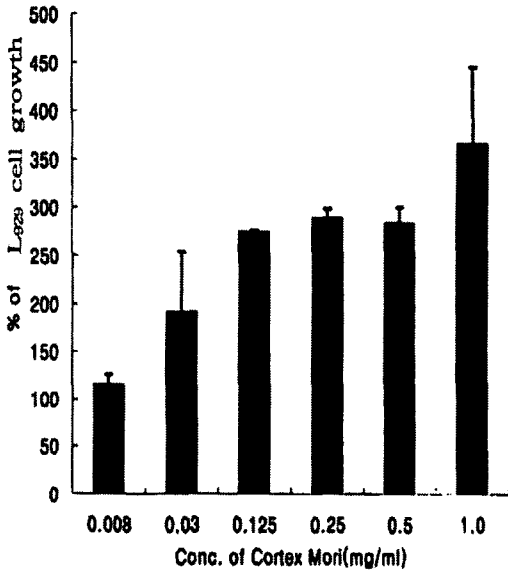


Fig 7. Inhibitory effect of Cortex Mori(CM) on TNF production from INF- γ -activated peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the presence of the indicated concentrations of CM and IFN- γ (25IU/ml). After 20 hours, TNF activity in the culture supernatant was measured by proliferation assay using actinomycin-D treated L929 fibroblasts as target cells. Values were expressed as the means \pm S.D.

Fig 8. Effect of Cortex Mori(CM) on TNF production from resting peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the presence of the indicated concentrations of CM. After 20 hours, TNF activity in the culture supernatant was measured by proliferation assay using actinomycin-D treated L929 fibroblasts as target cells. Values were expressed as the means \pm S.D.

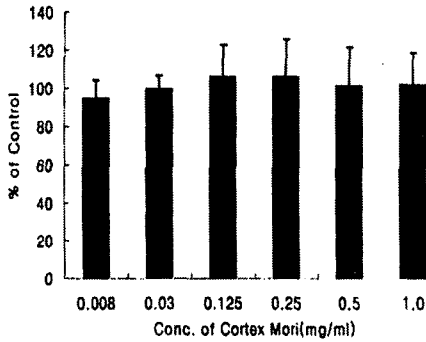


Fig 9. Effect of Cortex Mori(CM) on the viability of L929 fibroblasts.

L929 fibroblasts(5×10^4 cells/well) were cultured in culture medium. After 6 hours, culture supernatant was removed. And then, $100 \mu\text{l}$ of actinomycin-D($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) and indicated concentrations of CM in culture medium were added to the well where TNF-sensitive L929 cells were cultured. After 20 hours, viability was determined by tetrazolium salt assay. Values were expressed as the means \pm S.D.

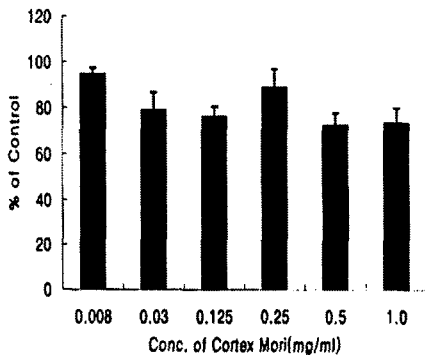


Fig 10. Effect of Cortex Mori(CM) on IL-1 production from LPS-stimulated peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the presence of the indicated concentrations of CM and LPS($20 \mu\text{g}/\text{ml}$). After 20 hours, IL-1 activity in the culture supernatant was determined by the proliferative response of thymocytes to Con-A($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Values were expressed as the means \pm S.D.

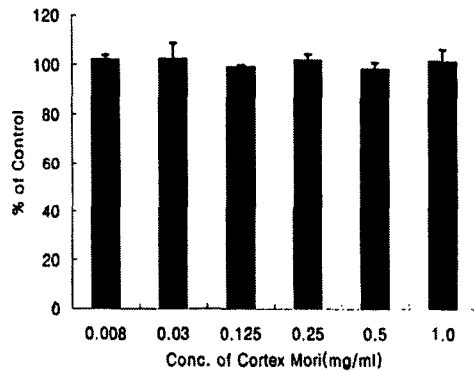


Fig 11. Effect of Cortex Mori(CM) on IL-1 production from resting peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages(1×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured in the presence of the indicated concentrations of CM. After 20 hours, IL-1 activity in the culture supernatant was determined by the proliferative response of thymocytes to Con-A($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Values were expressed as the means \pm S.D.

IV. 고찰

桑白皮(Cortex Mori)는 뽕나무과에 속한 落葉喬木인 뽕나무 *Morus alba* L. 및 同屬近緣植物의 뿌리껍질을 건조한 것으로 性味는 주로 甘寒하고 無毒하다고 하나, 문헌에 따라 辛하고 微苦⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹¹⁾한 性味가 추가된 것도 있다.

桑白皮의 甘寒한 性味는 下降하는 성질이 있어서 元氣를 助하여 補怯虛羸한다. 桑白皮의 辛味는 火邪를 瀉한다고 하였으니 이것은 肺氣를 瀉하는 것이 아니라 肺中の 火邪를 瀉하여 氣가 安하면 補血한다는 것이다.⁹⁾¹¹⁾¹⁴⁾

桑白皮는 土金의 氣를 稟하고 生하였는데 陽中の 陰에 속하고 性質은 升보다 降이 많다.⁷⁾⁹⁾¹¹⁾

桑白皮의 修治는 銅刀로 靑黃白皮를 제거한 다음 焙乾하고 咳嗽에 蜜炙하거나 炒하여 쓰고 咳嗽吐血에는 米泔浸한다.

桑白皮는 《神農本草經》에 “主傷中五勞六極羸瘦，崩中絕脈，補虛益氣”⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾라 수록된 이래로 瀉肺，利水道，縫金瘡，利小大腸，降氣散血，鎮咳，祛痰，消炎，利尿，解熱，鎮靜，降壓 등의 작용이 있으므로 肺中水氣唾血，熱渴，水腫腹滿，臃脹，咳嗽喘滿，氣管支炎，肺炎，肺水腫，吐血，濕性肋膜炎，面浮腫，小便不利，痰涎不利，肌膚邪熱，浮風燥痒 등에 사용¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾되고 있음을 문헌적으로 알 수 있다.

염증반응이란 신체에 외부로부터의 물리, 화학, 생물학적 물질이 침입했을 경우 대처하는 정상적인 현상으로서 혈관팽창, selectin, integrin, immunoglobulin superfamily 등의 adhesion molecule에 의해 대식세포 및 호중구(neutrophil) 등의 leukocyte의 반응을 촉진하기 위한 exudation, cytotoxin 분비, 손상된 세포를 대처하기 위한 주위 세포의 증식, 항체형성 등의 일련의 면역 반응이다.³¹⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾

염증반응 과정에서 분비되는 주요 물질은 크

게 2가지로 나눌수 있는데, 첫째 ROS와 RNS와 cytotoxin이고 둘째는 대부분 대식세포에서 분비되는 cytokine으로서 면역반응에 중요한 역할을 하며 외부침입 물질을 파괴하기도 하지만 동시에 정상세포의 DNA손상등 생체내 여러 물질에 악영향을 초래하기도 한다.³²⁾³³⁾⁴⁷⁾ 또한 염증반응은 직접 간접적으로 발암과정에도 관여한다. 즉, 발암과정에서 염증반응이 발생하면 생성된 cytokine에 의해 cytotoxin 분비가 촉진되고 세포의 증식을 유도하는 여러가지 성장인자(growth factor)들이 분비된다.³¹⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾ 항염증제로 사용되는 약물도 이러한 기전들을 차단시키는 것이 대부분이다. 이와 같이 염증반응이 발암과정에서 중요한 역할을 한다면, 염증을 억제하는 물질은 발암과정을 억제하여 암발생을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

한편, 대식세포는 탐식세포(phagocytic cell)로서 자연면역의 한 부분을 차지하며 감염원 및 기타 이물질을 섭취하고 또 많은 경우 이들을 파괴(destruction)시킨다. 또한 cytokine에 의해 활성화된 대식세포는 종양세포(tumor cell)와 바이러스에 감염되었거나 혹은 바이러스 항원(viral antigen)을 갖고 있는 세포를 비특이적으로 용해(lysis)시킬수 있으며, 이로인해 종양 및 바이러스 질환에 대한 숙주의 방어기전에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다.⁴⁹⁾ 또한, 대식세포는 특히 면역반응을 전개(developing)하는 데도 중요한 역할을 하는데 이때 대식세포는 항원을 섭취하여 이를 처리하고 최종적으로 분해된 성분을 T세포에 제공하여 T 및 B세포를 활성화 시키는 역할을 담당한다.²⁹⁾⁴⁹⁾ 또한 대식세포는 T세포에서 생성되는 lymphokines에 의해 활성화 되어 IL-1, TNF- α 등의 cytokine 및 NO를 생산하여 림프구나 종양세포에 작용을 나타내기도 하지만, superoxide 나 hydrogen peroxide 등의 반응산소 중간물질이나 NO등의 반응질소 중간물질을 생성하여 탐식된 이물질을

분해시킬 때 생성되는 IL-1과 TNF- α 등의 cytokine 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있다.⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾⁵³⁾ 이중 NO는 활성화된 대식세포로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해서 생성되며 지금까지 두가지 중요한 NOS form 이 확인되었다. 첫째는, endothelium과 neuron에 존재하는 Ca²⁺ 의존성인 constitutive NOS(cNOS)이고 둘째는 macrophage, smooth muscle cell 등에서 LPS 또는 여러가지 cytokin에 의해서 생산되는 Ca²⁺ 비의존성의 inducible NOS (iNOS)이다.⁵⁴⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾ 이중 cNOS는 생체내의 항상성(homeostasis) 유지에 주요한 역할을 하는 반면, iNOS 는 숙주방어에 주요한 역할을 한다.⁵⁶⁾ 이와 같이, NO의 균형유지는 많은 기관에서 항상성유지 및 병원 미생물의 침입에 매우 효과적인 무기가 될 수 있다.⁵⁶⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾ 그러나, NO 는 숙주에 손상을 주는 free radical 중의 하나로서, NO는 불안정하므로 O₂ 존재시 곧바로 NO₂, N₂O₃, N₂O₄, nitrate 및 nitrite 등의 안정한 nitrogen oxide를 생성하기 위해 분해된다. 이중 NO₂, N₂O₃, N₂O₄는 강력한 nitrosating agent로서 amine과 반응하여 carcinogenic nitrosamine을 생성시킨다.⁵⁹⁾ 또한, 이로 인하여 NO는 DNA repair를 저해할수 있는 prostaglandin을 과잉 생성하기도 한다.³⁷⁾⁶⁰⁾

또한 TNF- α 는 생체내에서 단독 또는 cytokines (특히 IL-1과 IFN- γ)과 협력 작용하여 몇몇 종양의 혈관조직을 손상 시킴으로써 종양괴사(tumor necrosis)를 유발시키거나 malaria 또는 legionella에 의한 감염, 몇몇 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시키기도 하지만, TNF- α 는 중요한 염증매개 인자중 하나로서, 어떤 환경하에서는 생체에 매우 해로운 영향을 미친다.²⁹⁾³⁰⁾ 이러한 유해작용중 특히 중요한 것은 내피세포(endothelial cell)과 호중구(neutrophil)에 작용하는 것으로서 내피세포에는 항응고성질(anticoagulant property)를 상실케하여 fibrin 침착을 증가시킴으로써 혈

관내응고 현상을 유발시킬 수 있으며 내피세포에 ICAM-1을 발현시켜 염증세포의 부착력을 증대시켜 염증세포가 염증부위를 빠져나가는 것을 촉진시킨다.²⁹⁾³⁰⁾ 호중구에는 내피세포로의 부착력을 증가시켜 탈과립(degranulation)과 ROS 형성을 촉진시킨다. 이로 인하여 TNF- α 는 순환 장애 및 광범위한 조직괴사를 유발할 수 있는 주요 매개인자로 간주되고 있으며 만성 염증성질환 상태에서 지방세포(adipocyte)의 lipoprotein lipase의 활성을 억제시켜 惡液質(cachexia)을 유발시키기도 한다.²⁹⁾³⁰⁾

한편, IL-1은 TNF- α 와 더불어 활성화된 대식세포로부터 생산되는 대표적인 염증매개성 cytokine 으로서 TNF- α 와 많은 부분에서 비슷한 생물학적 작용을 갖는 것으로 알려져 있는데, 그 작용으로는 내피세포에 ICAM-1유발, fibroblast 증식유도, collagenase와 PG 생산 자극, 급성기 반응(acute phase response) 및 혈관형성(angiogenesis)등을 들 수 있다.²⁹⁾³⁰⁾⁶¹⁾ 한편, 최근의 연구에 따르면 활성화된 대식세포에서 생산된 IL-1은 iNOS와 COX-2를 동시에 발현시킴으로써 NO와 PG생산을 유도시키며 이때 생산된 NO는 COX-2를 활성화시킴으로써 PG생산을 더욱더 촉진시킨다고 한다.³⁷⁾⁵¹⁾ 이와 같이 주로 대식세포에서 유래되는 NO, TNF- α 및 IL-1은 많은 염증성질환에서 주요한 염증매개 인자로서 작용하여 염증과정을 유지 또는 발전시키는데 주요한 역할을 한다. 그러므로 이들의 생산과 활성을 조절하는 것은 염증성 질환을 효과적으로 처리하는데 큰 도움이 될 수 있다.

한편, 桑白皮는 韓醫學에서 주로 여러 가지 肺實證을 치료하는 약재로서 이용되어 왔으며 부종(edema)과 창상치료에도 좋은 효과가 있다고 알려져 왔다.¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾

또한 근래 여러 연구자들에 의해 桑白皮추출액이 혈압강하 작용, 혈당강하 작용, 항균작용, 항바이러스 작용 및 항아라키돈산 대사작용이 있다고 보고¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾ 되었고 최근 국내

연구자들에 의해 桑白皮의 수용성 추출액이 항알러지효과(anti-allergic effect)가 있다고 보고²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽³⁸⁾ 하였다. 이러한 桑白皮의 작용들은 면역계 세포로부터 분비되는 여러 cytokine과 활성이온의 생산을 조절하여 발현되었을 것이라고 유추할 수 있다.

또한 약 1세기 전부터 항염증 및 항암효과가 있다고 알려졌은 epigallocatechin gallate(EGCG) carnosol 및 curcumin 등의 non-vitamine phytochemical 이 LPS와 IFN- γ 자극으로 활성화된 대식세포에서 NO생산을 유의하게 감소시켰다는 보고⁵⁹⁾ 및 curcumin이 TNF생산을 감소시켰다는 보고⁵⁹⁾ 등으로 미루어 예부터 항암, 항염증 및 항당뇨 등의 효과가 있다고 알려진 桑白皮도 이와 유사한 대식세포에 대한 효과가 있다고 추측할 수 있다.

이와 같이 桑白皮는 염증과 관계된 여러 가지 현상에 대해 억제효과가 있는 것으로 알려져 있으나 이같은 효과가 어떠한 경로를 통하여 나타나는지에 대한 보고는 드문 편이다.

이에 본 실험에서는 桑白皮의 수용성 추출물의 항염증작용의 기전을 알아보기 위하여 먼저, 시험관내 실험으로는 여러가지 자극물로 활성화된 복강 대식세포로부터의 nitric oxide (NO)TNF- α 및 IL-1 α 의 생산에 미치는 桑白皮의 효과를 조사 하였다. 한편, 생체내에는 대식세포의 활성화단계에 따라서 resident, responsive, primed 및 activated macrophages가 존재하며 자극물질에 따라서 다른 세포 활성화단계에 작용한다는 보고⁶²⁾에 따라서 NO 및 TNF- α 생산능에 미치는 桑白皮의 효과를 검색하기 위하여 자극물을 LPS 및 IFN- γ 로 나누어 실시하였다.

실험결과, 桑白皮는 NO 및 TNF의 생산을 LPS 및 IFN- γ 로 자극한 경우 모두에서 桑白皮의 농도 의존적으로 현저하게 감소시켰고, IL-1생산의 경우 그폭이 NO나 TNF에 비하여 적었으나 桑白皮의 농도 의존적으로 감소하는

양상을 보였다. 이러한 실험 결과는, 염증반응에 의한 1차 자극으로 미성숙대식세포(immature macrophage)가 반응성대식세포(responsive macrophage)로 변하고 저농도의 IFN- γ 혹은 lymphokine 에 의한 2차자극으로 primed macrophage로 변하며 LPS와 같은 endotoxin 또는 고농도의 IFN- γ 에 의하여 triggered cytotoxic macrophage로 변하여 arginase, protease, H₂O₂, lysosome, transferrin의 생산 및 C3와 C5의 활성화에 관여하고 자극물에 의한 활성화단계에 따라서 precursor differentiation, cell priming 및 trigger reaction state로 나눌 수 있다는 보고⁶²⁾를 감안하면, 桑白皮는 대식세포의 priming 및 triggering state 모두에 작용하여 염증 매개물질의 분비를 억제 조절 하였음을 알 수 있다.

또한, 본 실험에서는 이와 같은 *in vitro* 실험 결과를 *in vivo*에서 확인 하고자, mouse의 족척피하에 염증유발제인 carrageenan을 주입하여 실험적으로 염증반응을 유발시키고, 이들 mouse에 桑白皮를 염증 유발 30분전에 단 1회 투여하였던 바, carrageenan만을 단독 투여한 대조군에서는 고도의 종창반응을 보였으나, carrageenan과 桑白皮를 병합투여한 군에서는 종창 반응이 억제되었다.

이상의 본 실험성적을 종합하면, 수용성 桑白皮내에는 우수한 항염증 활성물질이 함유되어 있음을 알 수 있었고 또한 桑白皮의 항염증 활성은 桑白皮가 염증반응에 관여하는 여러가지 세포, 특히 대식세포의 염증 매개인자 생산을 조절하여 발현되었으리라는 가능성을 유추할 수 있었다. 그러나, 본 실험의 결과와 같은 효능을 지닌 분자가 단일 물질이 아니고, 여러 종류의 물질이 복합적으로 작용하여 항염증효과를 보일 수 있으므로 桑白皮를 우수한 항염증제로 개발하기 위해서는 桑白皮의 활성물질을 순수분리 및 정제가 선행되어야 되리라 사료되며, 또한 수용성 桑白피의 약리활성기전을 보다 구체적으로 밝히기 위한 많은 실험이 요망된다.

V. 결 론

桑白皮는 韓醫學에서 항염제, 이뇨제 및 거담제로 사용되어온 약제로서, 최근 연구보고에 따르면 桑白皮추출물은 혈압강하, 혈당강하, 항균, 항암 및 항아라키돈산 대사작용을 가지며,¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾ 수용성 추출물은 spermine 또는 compound 48/80으로 활성화된 비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리를 억제하는 작용이 있다고 한다.²⁷⁾²⁸⁾ 이러한 일련의 실험결과들은 桑白皮가 강력한 항염작용을 가지고 있을 가능성이 있다. 그러나 이러한 억제작용이 어떤 경로를 통하여 일어나는지에 대한 보고는 없다.

이에 본 실험에서는 수용성 桑白皮 추출물의 항염기전의 일부를 알아보고자 염증과정에서 대식세포로부터 생산되어 중요한 염증 매개인자로서 작용하는 nitric oxide(NO)종양괴사인자(TNF) 및 interleukin-1(IL-1)의 생산에 미치는 영향을 평가하고, 아울러 carrageenan 투여에 의한 edema 발생에 미치는 영향을 평가한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 桑白皮는 carrageenan으로 유도된 족척종창(Paw edema)의 정도로 평가한 염증반응을 억제시켰다.
2. 桑白皮는 LPS 또는 INF- γ 로 자극한 mouse 복강 대식세포로부터의 NO 및 TNF 생산을 현저하게 억제시켰으며, 이중 TNF의 생산은 대조군의 3-4배 정도까지 억제시켰다. 또한 桑白皮는 IL-1의 생산도 억제시켰으나 NO나 TNF의 억제정도에 비하여 적은 편이었다.

이상의 결과는 桑白皮의 수용성 추출물에는 항염 활성물질이 존재함을 알 수 있으며, 염증 관련 질병에서의 桑白皮의 항염증효과는 桑白皮가 염증관련 세포로부터 nitric oxide (NO)TNF 및 IL-1등의 염증매개인자의 분비를 차단하여

발현됨을 알 수 있다.

VI. 참고 문헌

1. 신민교: 임상본초학, 서울, 남산당, p.175, p.302, p.599, 1986.
2. 신길구: 신씨본초학, 서울, 수문사, p.16, p.627, p.724, 1981.
3. 구본홍: 국역 한글 동의보감, 서울, 민중서관, 초판, p.159, p.173, p.816, p.900, p.935, p.1105, 1993.
4. 전국한의학대학본초학교수: 본초학, 서울, 영림사, p.484, 1991.
5. 吳普等編: 神農本草經, 臺北, 自由出版社, p.166, 民國 58년.
6. 蘭茂: 滇南本草, 昆明, 雲南出版社, p.251, 1975.
7. 李時珍: 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, p.2063, p.2064, 1982.
8. 陶弘景: 本草經集註, 北京, 人民衛生出版社, p.285, 1994.
9. 陳嘉謨: 本草蒙筌, 北京, 人民衛生出版社, p.226, p.227, 1988.
10. 蘇敬等: 新修本草, 合肥市, 安徽科學技術出版社, p.335, 1981.
11. 王好古: 湯液本草, 北京, 人民衛生出版社, p.149, 1987.
12. 越亦成等: 淄博本草, 北京, 中國中醫藥出版社, p.73.
13. 張貴君等: 常用中藥鑑定大全, 하얼빈, 黑龍江科學技術出版社, p.716, p.717, 1993.
14. 常毅敏: 抗癌本草, 서울, 圖書出版 바람과 물결, p.352, 1988.
15. 中國醫學科學院藥用植物資源開發研究所等: 中藥志(第五冊)人民衛生出版社, p.482, p.490, 1994.
16. 陳榮道等: 中藥辭海(第二卷)北京, 中國醫藥科技出版社, p.2375, p.2378, 1996.

17. 顏正華 等: 中藥學, 北京, 人民衛生出版社, p.641, p.642.
18. 河北省革命委員會衛生局: 河北中草藥, 河北人民衛生出版社, p.932, p.933, 1977.
19. 醫藥研究社: 古今中藥集成, 臺南市, 正言出版社, p.253, 民國 63年.
20. 王本祥 等: 現代中藥藥理學, 天津, 天津科學技術出版社, p.1016, p.1017, 1997.
21. Nomura, T., Fukai, T., Hano, Y. and Uzawa, J., : Structure of saggenon C, a natural hypotensive diels-alder adduct from chinese crude drug "Sang-Bai-Pi" (Morus root barks), *Heterocycles*, 16: 2141, 1981.
22. 문관심: 약초의 성분과 이용, 과학 백과사전 출판사, p.146, 1984.
23. Ishitsuka, H., Ohsawa, C., Ohiwa, T., Umeda, I. and Suhara, Y.: Antipicornavirus flavone Ro09-0179, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22: 611, 1982.
24. Nomura, T.,: Phenolic constituents of the root barks of the mulberry tree. 28th Symposium on Phytochemistry, Abstract Papers, p.1, 1984.
25. Nomura, T., Fukai, T. and Fujiki, H.: Chemistry and biological activity of morus flavonoids. 2nd international symposium of plant flavonoids in biology and medicine. Abstract Paper, p29, Aug, Strasbourg, France, 1987.
26. Kimura, Y., Okuda, H., Nomura, T., Fukai, T. and Arichi, S.,: Effects of flavonoids and related compounds from mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelet hemogenates. *Chem. Pharm. Bull.(Japan)* 34 : 1223, 1986.
27. Kim, J.S. and Jun, B.D.,: Effects of cortex mori on mesenteric mast cells of the rat. *Chonbuk Univ. Med. J.* 10: 231-239, 1986.
28. Du, H.S., Park, B.K., Kim, J.S. and Lee, M.S. : Protective effect of cortex mori on mesenteric and peritoneal mast cell degranulation by triton X-100. *Korean J. Anat.* 20: 81-89, 1987.
29. Roit, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. and Livingstone, C.,: *Immunology*. Gower Medical Publishing, London, New York, 2nd edition, p.9.6-9.13, 1989.
30. Paul, W.E.,: *Fundamental immunology*. Raven Press, New York, 2nd edition, p.640-647, 1989.
31. Lee, B.M., Lee, J.E., Kim, T.J. and Cho, H.J.,: Role of inflammation in carcinogenesis. *Korean J. Toxicol.* 13(1,2): 1-21, 1997.
32. Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B., : DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett*, 93:113-120, 1995.
33. Cavaillon, J.M.,: Cytokines and macrophages, *Biomed. Pharmacother.* 48: 445-453, 1994.
34. IM, S.Y., Ko, Y.S., Lee, H.H., Lee, H.C., Lee, Y.B. and Chun, S.B.,: Effect of platelet-activating factor(PAF) on experimental tumor metastasis: Role of PAF in TNF- α mediated tumor metastasis. *Korean J. Immunol.* 18:55 -64, 1996.
35. Schultz, R.M. and Altom, M.G.,: Modulation of Interleukin-1 activity on murine thymocytes by various inhibitors of arachidonic acid oxygenation. *Immunopharmacology and Immuno-toxicology.* 10(1): 21-34, 1988.
36. Dayer, J.M., Beutler, B. and Cerami, A.,: Cachectin/Tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal

- fibroblasts. J. Exp. Med. 162:2163-2168, 1985.
37. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G. and Needleman, P.,: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7240-7244, 1993.
38. Kang, K.J., Jun, B.D., Chai, O.H. and Lee, M.S.,: Inhibitory effect of Mori Cortex on compound 48/80-induced histamine release and calcium uptake of rat peritoneal mast cells. Korean J. Immunol. 15(1):91-99, 1993.
39. Shen, H.M., Sha, L.X., Kennedy, J.L. and Ou, D.W.,: Adrenergic receptors regulates macrophage secretion. Int. J. Immunopharmac., 16(11): 905-910, 1994.
40. Otterness, I.G. and Moore, P.F.,: Carrageenan foot edema test, in "Methods in enzymology", Immunochemical techniques part L; chemotaxis and inflammation, eds Sabato GD, Academic Press, NY, USA, p.320-327, 1998.
41. Fu, Y. and Blankenhorn, E.P.,: Nitric oxide-induced anti-mitogenic effects in high and low responder rat strains. J. Immunol. 148: 2217-2222, 1992.
42. Kratz, S.S., and Kurland, R.T.,: Characterization of the pattern of inflammatory cell influx and cytokine production during the murine host response to *Listeria monocytogenes*. J. Immunol. 141:598-606, 1982.
43. Sodhi, A. and Kumar, R.,: Role of calcium and calmodulin in the activation of murine peritoneal macrophages with cisplatin. Int. J. Immunopharmac. 16(12):1003-1010, 1994.
44. Yeh, M., Chang, M. and Norman, D.C.,: Effects of exogenous cytokines on the ethanol-mediated suppression of murine thymocyte proliferation. Int. J. Immunopharmac. 18(3): 219-226, 1996.
45. Govan, D.T., Macfarlane, S. and Callander, R.,: Inflammation. In: Pathology illustrated, eds, Churchill livingstone, New York, p.33-50, 1995.
46. Cotran, R.S., Kumar, V. and Robbins, S.L.,: Inflammation and cancer. In : Robbins Pathologic basis of disease, W.B. Saunders Company, philadelphia, p.39-84. 1989.
47. Benchekroun, M.N., Parker, R., Dabholkar, M., Read, E. and Sinha, B.K.,: Effects of Interleukin-1 alpha on DNA repair in ovarian carcinoma(NIH:OVCAR-3) cells: implications in the mechanism of cis-diammine-dichloroplatinum(II). Mol. Pharmacol. 47:1255-1260, 1995.
48. Fries, K.M., Blieden, T., Looney, R.J., Sempowski, G.D., Silvera, M.R., Willis, R.A. and Phipps, R.P.,: Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. Clin. Immunol. Immunopathol. 72:283-292. 1994.
49. Milman, H.A. and Weisburger, E. K.,: Handbook of carcinogen testing, In: The role of immunotoxicity in carcinogen testing, 2nd edition, p.466-486, 1994.
50. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T: Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act as synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J. Immunol. 144:1425-1431, 1990.

51. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., and Corbett, J.A. : Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211:24-32, 1996
52. Corbett, J.A., and McDaniel, M.L. : Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta-cell function by inducing beta-cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 181:559-568, 1995.
53. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL: TNF- α and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*, 6: 399-406, 1994.
54. Barnes, P.J. and Liew, F.Y. : Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today*, 16(3):128-130, 1995.
55. Kolb, H. and Kolb-Bachfen, V. : Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunology Today*, 13(5):157-160, 1992.
56. Snyder SH and Brecht DS: Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, May, 28-35, 1992.
57. Yi, H., Nakashima, I. and Isobe, K. : Enhancement of nitric oxide production from activated macrophages by glycyrrhizin. *American J. Chinese Medicine*, 24(3-4): 271-278, 1996.
58. MacMicking, J., Xie, Q. and Nathan, C. : Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:323-350, 1997.
59. Chan, M.M., Ho, C. and Huang, H. : Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production. *Cancer letters*, 96:23-29, 1995.
60. Van-Rensburg, C.E., Van-Staden, A.M. and Anderson, R. : Inactivation of poly(ADP-ribose) polymerase by hypochlorous acid. *Free Radical Biol. Med.* 11:285-291, 1991.
61. Shen, H., Kennedy, J.L. and Ou, D.W. : Inhibition of cytokine release by cocaine. *Int. J. Immunopharmac.* 16(4): 295-300, 1994.
62. Paul, W.E. : *Fundamental immunology*. Raven Press, New York, 2nd edition, p.767-773, 1989.